

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-308481

(43)Date of publication of application : 02.12.1997

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
A23K 1/16
A23K 1/18
A23K 1/18
A23L 1/272
C09B 61/00
// C12N 15/09
C12Q 1/68
C12N 1/20
C12R 1:01)

(21)Application number : 08-128565

(71)Applicant : NIPPON OIL CO LTD

(22)Date of filing : 23.05.1996

(72)Inventor : TSUBOKURA AKIRA
YONEDA HISASHI
UCHIYAMA YOKO
MIZUTA YOSHINORI

(54) COLOR TONE IMPROVER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a color tone improver capable of improving color tone of epidermis, meat, egg, etc., of fishes and shellfishes and poultry by using culture solution of a specific microorganism, organism cell body, its decomposed material, its ground material and a carotenoid compound extracted and isolated therefrom.
SOLUTION: This color tone improver for improving color tone of epidermis, meat, egg, etc., of fishes and shellfishes and poultry is obtained by using a culture solution of a microorganism such as the microorganism E-396 strain (FERM BP-4283), its variant strain, the microorganism A-581-1 strain (FERM BP-4671) and its variant strain, microbial cell body thereof, a decomposed material of microbial cell body thereof and ground material of microorganism thereof and a carotenoid compound containing β -carotene, echinenone, 3hydroxyechinenone, canthaxanthin, adonirubin, β -cryptoxanthin, astaxanthin, asteroideone, adonixanthin, zeaxanthin, etc., extracted therefrom.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 17.08.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3278574

[Date of registration] 15.02.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-308481

(43) 公開日 平成9年(1997)12月2日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	Z N A		C 1 2 N 1/20	Z N A A
A 2 3 K 1/16	3 0 1		A 2 3 K 1/16	3 0 1 B
1/18			1/18	D
	1 0 2			1 0 2 A
A 2 3 L 1/272			A 2 3 L 1/272	
審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 14 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平8-128565	(71) 出願人	000004444
(22) 出願日	平成8年(1996)5月23日		日本石油株式会社
			東京都港区西新橋1丁目3番12号
		(72) 発明者	坪倉 章
			神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(72) 発明者	米田 久
			神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(72) 発明者	内山 洋子
			神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 日本石油株式会社中央技術研究所内
		(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 色調改善剤

(57) 【要約】

【課題】 動物用の新規な色調改善剤の提供。

【解決手段】 微生物E-396株FERM. BP-4283)、その変異株、微生物A-581-1株(FERM. BP-4671) およびその変異株から選ばれる微生物の培養液、該微生物菌体そのもの、該微生物菌体の分解物、該微生物菌体の破砕物、およびそれらから抽出または単離されるカロテノイド化合物から選ばれる色調改善剤。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微生物 E-396 株 (FERM BP-4283)、その変異株、微生物 A-581-1 株 (FERM BP-4671) およびその変異株から選ばれる微生物の培養液、該微生物菌体そのもの、該微生物菌体の分解物、該微生物菌体の破砕物、およびそれらから抽出または単離されるカロテノイド化合物から選ばれる色調改善剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、魚介類あるいは家禽類の表皮、肉または生産卵等の色調を改善するための色調改善剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 カロテノイド化合物は微生物の菌体、藻類あるいは植物および動物の組織および器官など天然に広く存在する色素である。カロテノイド化合物は食品、飲料の着色剤としての食品分野、サケ、マス、マダイ、エビなどの魚介類の肉あるいは表皮、ニワトリなどの家禽類の肉、表皮、卵黄の色調改善などを目的とした飼料分野での用途が拡大している。またカロテノイド化合物は抗酸化作用を持つことが知られており抗酸化剤としての用途も期待される。近年ある種のカロテノイド化合物に発ガン阻止効果が見いだされており今後は医薬品としての用途も期待されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 カロテノイド化合物の飼料分野での大きな用途に動物の表皮、肉またはそれらの生産卵の色調改善剤としての利用がある。例えばサケ、マス、マダイなどの魚介類用の色揚げ剤としてアスタキサンチン、カンタキサンチンなどが使用されている。またニワトリなどの家禽類の表皮、肉および卵黄の色調を改善する方法としてカンタキサンチン、アスタキサンチン、ゼアキサンチン、カプサンチンなどを飼料に添加することが知られている。

【0004】 カンタキサンチンは化学合成品があるのみで天然品は工業的には生産されていない。化学合成品は安全性の面および近年の天然物指向の状況から問題がある。アスタキサンチンは化学合成品および天然物由来の

ものが存在するが、化学合成品は安全性の面および近年の天然物指向の状況から問題がある。アスタキサンチン天然品はオキアミやザリガニからの抽出によって得られるが含有量が少ないこと、安定供給が困難なこと、コスト高の点から問題がある。またアスタキサンチンを生産する赤色酵母ファフィア・ロドチマ (*Phaffia rhodozyma*) は強固な細胞壁を持つためにそのままの菌体で供給しても吸収効率は極めて低く菌体を機械的に粉碎、あるいは化学薬品、酵素などで分解する必要があるコストの面で問題がある。

【0005】 しかも菌体を分解した状態ではカロテノイド化合物の安定性が低下する問題も生じる。またアスタキサンチンを生産する緑藻類 (*Haematococcus*) も細胞壁が固いために、そのままでは着色効果が低いのがファフィア酵母と同様に問題である。ゼアキサンチンはマリーゴールド等から抽出しているが、色調が黄色であり用途が限定されるのが欠点である。カプサンチンはパプリカに含まれるカロテノイドで卵黄の着色に用いられているが、熱、光などに極めて不安定であること、パプリカの生育状態が天候に大きく左右されるために工業的安定供給が困難であるなどの欠点を有する。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、本発明を完成した。すなわち、微生物 E-396 株 (FERM BP-4283)、その変異株、微生物 A-581-1 株 (FERM BP-4671) およびその変異株から選ばれる微生物の培養液、該微生物菌体そのもの、該微生物菌体の分解物、該微生物菌体の破砕物、およびそれらから抽出または単離されるカロテノイド化合物から選ばれる色調改善剤に関する。

【0007】 本発明に使用する微生物としてはまず E-396 株を挙げることができる。この株は、本発明者らが新しく単離したものであり、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成 5 年 4 月 27 日に FERM BP-4283 として寄託された。この菌株は次の菌学的性質を有する。

【0008】

【表 1】

(a) 形態的性質

- ① 細胞の形及び大きさ
桿菌、 $0.5 \sim 0.75 \times 1.0 \sim 5.0 \mu m$
- ② 多形性 有り
- ③ 運動性 有り、周毛を有する
- ④ 孢子形成 無し

(b) 培養的性質

- ① 肉汁寒天平板培養
円形でオレンジ色の光沢のある集落を形成する。
拡散性色素は生成しない。
- ② 肉汁液体培養
発育やや不良で全体に混濁し菌の沈澱あり。表面発育はない。
- ③ 肉汁ゼラチン穿刺培養
生育は不良でゼラチンを液化しない。
- ④ リトマス・ミルク
変化しない。

(c) 生理学的性質

- ① グラム染色性 陰性
- ② 硝酸塩の還元 陰性
- ③ 脱窒反応 陰性
- ④ MRテスト 陰性
- ⑤ VPテスト 陰性
- ⑥ インドールの生成 陰性
- ⑦ 硫化水素の生成 陰性
- ⑧ デンプンの加水分解 陰性
- ⑨ クエン酸の利用
Koserの培地 陰性
Christensenの培地 陰性

【0009】

【表2】

- ⑩ 無機窒素源の利用
 硝酸塩 陰性
 アンモニウム塩 陽性
- ⑪ 色素の生成 有り（非水溶性）
- ⑫ ウレアーゼ 陰性
- ⑬ オキシダーゼ 陽性
- ⑭ カタラーゼ 陽性
- ⑮ 生育の範囲 (1) pH pH 6 ~ pH 9 で生育（最適：pH 7）
 (2) 温度 10℃ ~ 33℃ で生育（最適：28℃）
- ⑯ 酸素に対する態度 好気性
- ⑰ O-F テスト 酸化（Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを0.1%添加した。）
- ⑱ 糖類からの酸およびガスの生成の有無
 （Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを0.1%添加した。）

	酸	ガス
(1) L-アラビノース	+	-
(2) D-キシロース	+	-
(3) D-グルコース	+	-
(4) D-マンノース	+	-
(5) D-フラクトース	-	-
(6) D-ガラクトース	+	-
(7) マルトース	+	-
(8) シュクロース	+	-
(9) ラクトース	+	-
(10) トレハロース	+	-
(11) D-ソルビトール	+	-
(12) D-マンニトール	+	-
(13) イノシトール	-	-
(14) グリセリン	+	-
(15) デンプン	-	-

【0010】

【表3】

(d) その他の生理学的性質

① エスクリン分解	陽性
② アルギニンジヒドロラーゼ	陰性
③ 3-ケトラクトースの生成	陰性
④ PNPG	陽性
⑤ スライムの形成	陰性
グルコース	陰性
シュクロース	陰性
⑥ 資化性 (API 20NEキットによる)	
(1) グルコース	陽性
(2) L-アラビノース	陰性
(3) D-マンノース	陽性
(4) マンニトール	陽性
(5) N-アセチル-D-グルコサミン	陰性
(6) マルトース	陽性
(7) グルコン酸カリウム	陽性
(8) n-カプロン酸塩	陰性
(9) アジピン酸	陰性
(10) d1-リンゴ酸	陽性
(11) クエン酸ナトリウム	陰性
(12) 酢酸フェニル	陰性

(e) 化学分類学的性質

① 菌体内DNAのGC含量 (HPLC法)	67モル%
② キノン系	Q-1.0
③ バクテリオクロロフィル	生育せず
嫌気下での産生	陰性
好気下での産生	陰性
④ スフィンゴ脂質の存在	陰性

【0011】

【表4】

⑤ 菌体脂肪酸組成

脂肪酸	割合 (%)
C16:0	0.8
C16:1	0.1
C17:0	0.5
C18:0	9.0
C18:1	81.4
C19:0	0.4
<hr/>	
2-OH C14:0	0.2
3-OH C14:0	0.6

⑥ 近縁菌種とのDNA-DNA相同性 (HPLC法)

試験菌株	相同値 (%)
Flavobacterium okeanokoites IFO 12536	2
Flavobacterium resinovorum ATCC 33545	23
Flavobacterium aquatile IFO 15052	0
Agrobacterium tumefaciens IFO 15193	0
Agrobacterium radiobacter IFO 12532	7
Mycoplana bullata IFO 13290	32
Mycoplana segnis IFO 15250	26
Mycoplana ramosa IFO 15249	9
Mycoplana dimorpha IFO 13291	11
Xanthobacter flavus IFO 14759	24
Sphingomonas paucimobilis IFO 13935	6

【0012】

【表5】

⑦ 16S リボソームRNAをコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 1)

AGTTTGATCC TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT AACACATGCA AGTCGAGCGA	60
GACCTTCGGG TCTAGCGGG GACGGGTGAG TAACCGCTGG GAACGTGCCC TTCTCTACGG	120
AATAGCCCCG GAAACTGGG AGTAATACCG TATACGCCCT TTGGGGGAAA GATTATCCG	180
AGAAGGATCG CCCCCGCTG GATTAGCTAG TTGGTGGGGT AATGGCCAC CAAGCCGACG	240
ATCCATAGCT GGTTCGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACAGG GCCCAGACTC	300
CTACGGGAGG CAGCACTGGG GAATCTTAGA CAATGGGGGC AACCCTGATC TAGCCATGCC	360
GCCTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCA GCTGGGAAGA TAATGACGCT	420
ACCAGCAGAA GAAGCCCCGG CTAACCTCCT GCCAGCAGCC CGGTAATAC GGAGGGGGCT	480
AGCCTTCTTC GCAATTACTG GCGTAAAGC GCACGTAGGC GGACTGGAAA GTCAGAGGTG	540
AAATCCAGG GCTCAACCTT GGAAGTGCCT TTGAACTAT CAGTCTGGAG TTCGAGAGAG	600
GTGAGTGGAA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGGAGGAA CACCACTGGC	660
GAAGCGGGCT CACTGGCTCG ATACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAACACGG	720

【0013】

【表6】

ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGATGAATGC CAGACGTCGG CAAGCATGCT 780
 TGTCGGTGTC ACACCTAACG GATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGATTAA 840
 AACTCAAAGG AATTGACGGG GGGCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTGGAAGC 900
 AACGCGCAGA ACCTTACCAA CCCTTGACAT GGCAGGACCG CTGGAGAGAT TCAGCTTTCT 960
 CGTAAGAGAC CTGCACACAG GTGCTGCATG GCTGTCGTC GCTCGTGTGG TGAGATGTTT 1020
 GGTAAAGTCC GGCAACGAGC GCAACCCACG TCCCTAGTTG CCAGCAATTC AGTTGGGAAC 1080
 TCTATGAAA CTGCCGATGA TAAGTCGGAG GAAGGTGTGG ATGACGTCAA GTCCTCATGG 1140
 GCCTTACGGG TTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGTGGTG ACAGTGGGTT AATCCCCAAA 1200
 AGCCATCTCA GTTCGGATTG TCCTCTGCAA CTCGAGGGCA TGAAGTTGGA ATCGCTAGTA 1260
 ATCGCGGAAC AGCATGCCGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC 1320
 ACCATGGGAG TTGGTTCTAC CCGACGACGN TCGGCTAACC TTGGGGGGGC AGGCGGCCAC 1380
 GGTAGGATCA GCGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAGC CGTAGGGGAA CCTGCGGCTG 1440
 GATCACCTCC TT 1452

【0014】以上の結果からE-396株は好気性のグラム陰性の桿菌で周毛を有していることからアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属細菌と思われたが色素産生能とスライム形成能、およびDNA-DNA相同性の結果から否定された。また集落の色調から *Sphingomonas* 属細菌や光合成細菌の可能性も考えられたが、スフィンゴ脂質およびバクテリオクロフィルが検出されずいずれの属の菌株でもないことが分かった。集落の色調、周毛、GC含量、キノン系からE-396株と菌縁と推定される各菌種の保存菌株とDNA-DNA相同性を調べたが高い相同値を示した属は得られなかった。さらにE-396株の16SリボソームRNAの塩基配列から近隣結合法により分子系統樹を作成した。

【0015】その結果E-396株は近縁のいずれの属とも系統的に独立していることが分かった。よってE-396株は既知の属ではない全く新規な属に属する細菌であることが確認された。本発明において使用する他の微生物としてはA-581-1株を挙げることができる。この菌株は、本発明者らが新しく単離したものであり、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成6年5月20日にFERM BP-4671として寄託された。この菌株は次の菌学的性質を有する。

【0016】

【表7】

(a) 形態的性質

- | | |
|-------------|-------------------|
| ① 細胞の形及び大きさ | 桿菌、0.5~1.0×3.5 μm |
| ② 多形性 | 有り |
| ③ 運動性 | 有り、周毛を有する |
| ④ 胞子形成 | 無し |

(b) 培養的性質

- | | |
|--------------|------------------------------------|
| ① 肉汁寒天平板培養 | 円形でオレンジ色の光沢のある集落を形成する。拡散性色素は生成しない。 |
| ② 肉汁液体培養 | 全体に混濁し菌の沈澱あり。表面発育はない。 |
| ③ 肉汁ゼラチン穿刺培養 | 生育は不良でゼラチンを液化しない。 |
| ④ リトマス・ミルク | 変化しない。 |

(c) 生理学的性質

- | | |
|----------------|----|
| ① グラム染色性 | 陰性 |
| ② 硝酸塩の還元 | 陰性 |
| ③ 脱窒反応 | 陰性 |
| ④ MRテスト | 陰性 |
| ⑤ VPテスト | 陰性 |
| ⑥ インドールの生成 | 陰性 |
| ⑦ 硫化水素の生成 | 陰性 |
| ⑧ デンプンの加水分解 | 陰性 |
| ⑨ クエン酸の利用 | 陰性 |
| Koserの培地 | 陰性 |
| Christensenの培地 | 陰性 |

【0017】

【表8】

- ⑩ 無機窒素源の利用
 硝酸塩 陰性
 アンモニウム塩 陽性
- ⑪ 色素の生成 有り（非水溶性）
- ⑫ ウレアーゼ 陰性
- ⑬ オキシダーゼ 陽性
- ⑭ カタラーゼ 陽性
- ⑮ 生育の範囲 (1) pH pH 6～pH10で生育（最適：pH 8）
 (2) 温度 10℃～33℃で生育（最適：28℃）
- ⑯ 酸素に対する態度 好気性
- ⑰ O-Fテスト 酸化（Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを0.1%添加した。）
- ⑱ 糖類からの酸およびガスの生成の有無
 （Hugh-Leifson試験法の培地に酵母エキスを0.1%添加した。）

	酸	ガス
(1) L-アラビノース	+	-
(2) D-キシロース	+	-
(3) D-グルコース	+	-
(4) D-マンノース	+	-
(5) D-フラクトース	+	-
(6) D-ガラクトース	+	-
(7) マルトース	+	-
(8) シュクロース	+	-
(9) ラクトース	+	-
(10) トレハロース	+	-
(11) D-ソルビトール	-	-
(12) D-マンニトール	+	-
(13) イノシトール	-	-
(14) グリセリン	+	-
(15) デンプン	-	-

【0018】

【表9】

(d) その他の生理学的性質

- | | |
|----------------|----|
| ① エスクリン分解 | 陽性 |
| ② アルギニンジヒドロラーゼ | 陰性 |
| ③ 3-ケトラクトースの生成 | 陰性 |
| ④ PNPG | 陽性 |
| ⑤ スライムの形成 | |
| グルコース | 陰性 |
| シュークロース | 陰性 |

⑥ 資化性 (API 20NEキットによる)

- | | |
|---------------------|----|
| (1) グルコース | 陽性 |
| (2) L-アラビノース | 陽性 |
| (3) D-マンノース | 陰性 |
| (4) マンニトール | 陽性 |
| (5) N-アセチル-D-グルコサミン | 陰性 |
| (6) マルトース | 陰性 |
| (7) グルコン酸カリウム | 陰性 |
| (8) α-カプロン酸塩 | 陰性 |
| (9) アジピン酸 | 陰性 |
| (10) d-リリンゴ酸 | 陽性 |
| (11) クエン酸ナトリウム | 陰性 |
| (12) 酢酸フェニル | 陰性 |

(e) 化学分類学的性質

- | | |
|------------------------------|--------|
| ① 菌体内DNAのGC含量 | 66モル% |
| ② キノン系 | Q-10 |
| ③ バクテリオクロロフィル | |
| 嫌気下での産生 | 生育せず |
| 好気下での産生 | 陰性 |
| ④ スフィンゴ脂質の存在 | 陰性 |
| ⑤ E-396株とのDNA-DNA相同性 (HPLC法) | 相同値56% |

【0019】以上の結果からA-581-1株はE-396株と共通の性質を有することおよびE-396株とのDNA-DNA相同性が高いことからE-396株と同一の新規な属に属する細菌であると判断された。これらの菌株の培養方法はカロテノイド化合物を生成する条件であればいずれの方法でもよいが、例えば次の通りである。すなわち、生産菌が生育に必要な炭素源、窒素源、無機塩、および必要であれば特殊な要求物質（例えば、ビタミン、アミノ酸、核酸塩基等）を含む。

【0020】炭素源としてはグルコース、シュークロース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール、マルトース等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、イソブタノール等のアルコール類等が挙げられる。添加割合は炭素源の種類により異なるが、通常培地1L当たり1~100g、好ましくは2~50gである。窒素源としては、例えば硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、アンモニア、尿素等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は窒素源の種類により異なるが、通常培地1Lに対し0.1g~10g、好ましくは1~3gである。

【0021】無機塩としてはリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸鉄、塩化鉄、硫酸マンガン、塩化マンガン、硫酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は無機塩の種類により異なるが、通常培地1Lに対し0.001~10gである。特殊な要求物質としてはビタミン類、核酸類、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、麦芽エキス、コーンステープリカー、乾燥酵母、大豆粕、大豆油、オリーブ油、トウモロコシ油、アマニ油、等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は物質の種類により異なるが、通常、培地1Lに対し1g~200g、好ましくは10~100gである。

【0022】培地のpHは2~12、好ましくは6~10に調整する。培養条件は15~80℃、好ましくは20~35℃の温度であり、通常1日~20日間、好ましくは2~8日間振とう培養あるいは通気攪拌培養を行う。以上の方法で生産した培養菌体中には通常アスタキサンチン、アドニキサンチン、β-カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチン、β-クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン等のカロテノイド化合物が混合物とし

て蓄積する。これら菌体中に含まれるカロテノイド化合物の生成比率を対象動物などの用途に合わせて調整することもできる。

【0023】例えば、培養における好気条件を変えることにより、カロテノイド化合物の生成比率を変えることができる。一例として培養液中の溶存酸素濃度を高めることによりアドニキサンチンの生成比率を高めることができる。他の方法として、カロテノイド色素の特定のものを優先的に生成させるために生成菌株を変異、例えば人為的変異処理により一方の成分を他方の成分より優先的に生成するように改良することができる。このような変異処理としては、例えばX線照射、紫外線照射等の物理的方法、化学変異剤、例えばNTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) とEMS (ethyl methane sulfonate) 等による変異処理のような化学的方法を用いることができる。

【0024】本発明では対象動物に、微生物E-396株 (FERM BP-4283)、その変異株、微生物A-581-1株 (FERM BP-4671) およびその変異株から選ばれる微生物の培養液、該微生物菌株そのもの、該微生物菌体の分解物、該微生物菌体の破砕物、およびそれらから抽出または単離されるカロテノイド化合物から選ばれる色調改善剤の1種以上を与えるが、そのまま単独で与えてもよいし、飼料と混合して与えても良い。

【0025】培養液の水分が障害となる場合にはスプレードライヤー等により乾燥して用いることもできる。また培養液から菌体のみを分離する場合には通常の濾過法、遠心分離法などにより行うことができる。分離で得られた水分を含む菌体はそのまま与えてもよいし、スプレードライヤー等により乾燥して用いることもできる。また菌体の細胞を酵素的処理、酸加水分解等の化学的処理により分解または超音波処理、加圧破砕処理等の物理的処理により破砕して用いることもできる。

【0026】またカロテノイド化合物は菌体の内部に生成するから菌体からカロテノイド化合物を溶剤で抽出することもできる。ここで用いる溶剤はカロテノイド化合物が溶解する化合物であればいずれの溶剤を使用することができる。例えばアセトン、クロロホルム、ジクロロメタン、ヘキサン、テトラヒドロフラン、シクロヘキサン、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、ベンゼン、二硫化炭素、ジエチルエーテル等の有機溶剤が用いられ、好ましくはクロロホルム、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、アセトン、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコールが用いられる。またそれぞれのカロテノイド化合物を単離精製することもできる。生成には吸着、溶出、溶解などの通常の方法を用いることができる。

【0027】本発明の色調改善剤はそのまま飼料として

用いてもよいが、これらに含まれるカロテノイドの分解を防止する目的でBHT (ブチルヒドロキシトルエン)、エトキシキン、ビタミンEなどの酸化防止剤を添加することも好ましく採用される。さらには、これらの表面をゼラチンなどで被覆しても良い。着色の対象となる動物は色調がその価値を高めるものであればいずれでも良く例えば魚介類であれば、マダイ、ギンザケ、ニジマス、シマアジ、マス、ハマチ、金魚、ニシキゴイ、クルマエビ、イセエビなどが挙げられ、表皮、肉、卵の色調が改善される。また家禽類ではニワトリ、ウズラなどが挙げられ表皮、肉、卵黄の色調が改善される。

【0028】また本発明の色調改善剤を飼料と混合する場合は飼料と粉末状で混合、ペレット状あるいはフレーク状にして用いることができる。また本菌株の菌体を分解あるいは粉碎しないで与える場合の長所は、吸収効率が極めて良いことである。すなわち本発明の菌体は細菌に属し、細胞壁は薄く、強固ではないことから動物体内で分解されやすく吸収効率が極めて高い。これに対し、赤色酵母ファフィア・ロドチーマでは強固な細胞壁を有するために動物体内でカロテノイド化合物が吸収されるためには細胞壁が分解される必要があるため吸収効率は悪い。

【0029】本発明に使用する菌株が生産するアスタキサンチンは(3S, 3'S)-アスタキサンチンでありその純度はほぼ100%である。天然物であるザリガニ、ヘマトコッカス、サゲ、マス、マダイに存在するアスタキサンチンは(3S, 3'S)体の含有率が高いことが知られている。一方ファフィア・ロドチーマは(3R, 3'R)体の含有率が多く天然に存在するアスタキサンチンとは反対の絶対配置を持つことが知られている。本発明の菌株が生産するアスタキサンチンは100%の(3S, 3'S)-アスタキサンチンであり天然において多数を占めるアスタキサンチンと同一の絶対配置を有することは産業上価値が高い。

【0030】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

実施例1: 表10の組成からなる培地10mLを直径18mmの試験管に入れ121°C、15分間蒸気殺菌した。これにE-396株 (FERM BP-4283) を1白金耳接種し30°Cで2日間300rpmの往復振とう培養を行った。この培養液10mLを上と同組成の培地が100mL入った500mL容量の坂口フラスコ6本に接種し30°C、2日間100rpmの往復振とう培養を行った。

【0031】次にこの培養液600mLを上と同組成の培地が20L入った30L容量の発酵槽に接種し30°C、300rpm、1.0vvmの好気培養を76時間行った。培養液18Lからシャーププレス型遠心分離機により菌体(湿重量550g)を得た。この菌体に水道水を10L

添加し十分懸濁した後、再度シャープレス型遠心分離機により菌体（湿重量540g）を得た。次いで菌体540gに水道水を1000L添加し十分懸濁後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥し菌体乾燥物185gを得た。運転条件は入口空気温度200℃、出口空気温度

表 10

100℃、懸濁液供給速度46mL/minで行った。乾燥菌体物中のカロテノイド含有量を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ表11の組成であった。

【0032】

【表10】

組 成	添加量 g/L
酵母エキス	20
しょ糖	30
KH ₂ PO ₄	1.5
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	3.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.01

pH.7 (Na₂CO₃で調整)

【0033】

【表11】

表 11

カロテノイド化合物	含有量 mg/g
β-カロテン	0.34
エキネノン	0.16
3-ヒドロキシエキネノン	0.06
カンタキサンチン	0.16
アドニルビン	0.40
β-クリプトキサンチン	0.01
アスタキサンチン	1.50
アステロイデノン	0.02
アドニキサンチン	0.72
ゼアキサンチン	0.02

【0034】次に、40週齢の白色レグホン（10羽）を一つのケージに入れ日本配合飼料（株）製のレイヤー試験用標準飼料に上記の方法で得られた菌体乾燥物を0.5mass%添加した飼料を3週間与えた。卵黄の色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ明らかに赤色の着色が認められ色調が改善された。

【0035】実施例2. 10週齢の白色レグホン（10羽）を一つのケージに入れ日本配合飼料（株）製のレイヤー試験用標準飼料に実施例1で得られた菌体乾燥物を

1. 5mass%添加した飼料を3週間与えた。表皮、肉の色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ明らかに赤色の着色が認められ色調が改善された。

【0036】実施例3. マダイの稚魚（60～70g）20匹に対し実施例1で得られた菌体乾燥物を4.0mass%添加した飼料を調整し、90日間連続添加した。体表の色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ赤色の着色が認められ色調が改善された。

【0037】実施例4. E-396株（FERM BP-4283）をNTG（N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine）で変異処理し、色調が異なるコロニーを選択した。これらの株の培養液中のカロテノイド化合物を分析し、アスタキサンチンを生産せずカンタキサンチンを生産する株（カンタキサンチン生産変異株）を選択した。第1表の組成からなる培地10mLを直径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにカンタキサンチン生産変異株を1白金耳接種し30℃で2日間300rpmの往復振とう培養を行った。この培養液10mLを上と同組成の培地が100mL入った500mL容量の坂口フラスコ6本に接種し30℃、2日間100rpmの往復振とう培養を行った。

【0038】次にこの培養液600mLを上と同組成の培地が20L入った30L容量の発酵槽に接種し30℃、300rpm、1.0vvmの好気培養を76時間行った。培養液18Lからシャープレス型遠心分離機により菌体

(湿重量500g)を得た。この菌体に水道水を10L添加し十分懸濁した後、再度シャープレス型遠心分離機により菌体(湿重量480g)を得た。次いで菌体480gに水道水を1000L添加し十分懸濁後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥し菌体乾燥物170gを得た。運転条件は入口空気温度200℃、出口空気温度100℃、懸濁液供給速度46mL/minで行った。乾燥菌体物中のカロテノイド含有を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ表12の組成であった。

【0039】

【表12】

表 12

カロテノイド化合物	含有量 mg/g
β-カロテン	0.72
エキネノン	0.78
カンタキサンチン	2.36
アドニルピン	0.68
アスタキサンチン	0.06
アドニキサンチン	0.02

【0040】次に、40週齢の白色レグホン(10羽)を一つのケージに入れ日本配合飼料(株)製のレイヤー試験用標準飼料に上記の方法で得られた菌体乾燥物を0.3mass%添加した飼料を3週間与えた。卵黄の色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ明らかに橙色の着色が認められ色調が改善された。

【0041】実施例5: 10週齢の白色レグホン(10羽)を一つのケージに入れ日本配合飼料(株)製のレイヤー試験用標準飼料に実施例1で得られた菌体乾燥物を0.9mass%添加した飼料を3週間与えた。表皮、肉の

色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ明らかに橙色の着色が認められ色調が改善された。

【0042】実施例6: 表13の組成からなる培地10mLを直径1.8mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌した。これにA-581-1株(FERM BP-4671)を1白金耳植菌し30℃で2日間300rpmの往復振とう培養を行った。この培養液10mLを表1と同組成の培地が100mL入った500mL容量の坂口フラスコ6本に植菌し30℃、2日間100rpmの往復振とう培養を行った。次にこの培養液600mLを表1と同組成の培地が20L入った30L容量の発酵槽に植菌し30℃、300rpm、1.0vvmの好気培養を80時間行なった。培養液18Lからシャープレス型遠心分離機により菌体(湿重量400g)を得た。

【0043】この菌体に水道水を10L添加し十分懸濁した後、再度シャープレス型遠心分離機により菌体(湿重量380g)を得た。次いで菌体380gに水道水を1000L添加し十分懸濁後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥し菌体乾燥物120gを得た。運転条件は入口空気温度200℃、出口空気温度100℃、懸濁液供給速度46mL/minで行った。乾燥菌体物中のカロテノイド含有を高速液体クロマトグラフィーにより分析したところ表14の組成であった。次に、40週齢の白色レグホン(10羽)を一つのケージに入れ日本配合飼料(株)製のレイヤー試験用標準飼料に上記の方法で得られた菌体乾燥物を1.2mass%添加した飼料を3週間与えた。卵黄の色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ明らかに赤色の着色が認められ色調が改善された。

【0044】

【表13】

表 13

組 成	添加量 g/L
酵母エキス	5
ポリペプトン	5
グルコース	30
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
pH 8 (Na ₂ CO ₃ で調整)	

【0045】

【表14】

表 14

カロテノイド化合物	含有量 mg/g
β-カロテン	0.15
アスタキサンチン	0.65
アドニキサンチン	0.22

【0046】実施例7. 10週齢の白色レグホン（10羽）を一つのケージに入れ日本配合飼料（株）製のレイヤー試験用標準飼料に実施例6で得られた菌体乾燥物を3.5mass%添加した飼料を3週間与えた。表皮、肉の色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ明らかに赤色の着色が認められ色調が改善された。

配列

```

AGTTTGATCC TGGCTCAGAA CGAACGCTGG CGGCAGGCTT AACACATGCA AGTCGAGCGA 60
GACCTTCGGG TCTAGCGGCG GACGGGTGAG TAACGCGTGG GAACGTGCCC TTCTCTACGG 120
AATAGCCCGG GGAACTGGG AGTAATACCG TATACGCCCT TTGGGGGAAA GATTATACGG 180
AGAAGGATCG GCCCGCGTTG GATTAGGTAG TTGGTGGGGT AATGGCCAC CAAGCCGACG 240
ATCCATAGCT GGTTTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC 300
CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATCTTAGA CAATGGGGGC AACCTGATC TAGCCATGCC 360
GCGTGAGTGA TGAAGGCCTT AGGTTGTAA AGCTCTTTCA GCTGGGAAGA TAATGACGGT 420
ACCAGCAGAA GAAGCCCGG CTAACCTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGGGCT 480
AGCGTTGTTC GGAATTACTG GGCCTAAAGC GCACGTAGGC GGAAGTGGAA GTCAGAGGTG 540
AAATCCGAGG GCTCAACCTT GGAAGTGCCT TTGAACTAT CAGTCTGGAG TTCGAGAGAG 600
GTGAGTGGAA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGGAGGAA CACCAGTGGC 660
GAAGGCGGCT CACTGGCTCG ATACTGACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGG AGCAAACAGG 720
ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCCGTAAA CGATGAATGC CAGACGTCGG CAAGCATGCT 780
TGTCGGTGTG ACACCTAACG GATTAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGGTC GCAAGATTAA 840
AACTCAAAGG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTGGAAGC 900
AACGCGCAGA ACCTTACCAA CCCTTGACAT GGCAGGACCG CTGGAGAGAT TCAGCTTTCT 960
CGTAAGAGAC CTGCACACAG GTGCTGCATG GCTGTCGTCA GCTCGTGTG TGAGATGTTT 1020
GGTTAAGTCC GGCAACGAGC GCAACCCAGC TCCCTAGTTG CCAGCAATTC AGTTGGGAAC 1080
TCTATGGAAA CTGCCGATGA TAAGTCGGAG GAAGGTGTGG ATGACGTCAA GTCCTCATGG 1140
GCCTTACGGG TTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGTGGT ACAGTGGGTT AATCCCCAAA 1200
AGCCATCTCA GTTCGGATTG TCCTCTGCAA CTCGAGGGCA TGAAGTTGGA ATCGCTAGTA 1260

```

【0049】

```

ATCGCGGAAC AGCATGCCGC GGTGAATACG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC 1320
ACCATGGGAG TTGTTCTAC CCGACGACGN TCGCTAACCC TTCGGGGGGC AGGCGGCCAC 1380
GGTAGGATCA GCGACTGGGG TGAAGTCGTA ACAAGGTAGC CGTAGGGGAA CCTGCGGCTG 1440
GATCACCTCC TT 1452

```

【0047】実施例8. マダイの稚魚（60～70g）20匹に対し実施例6で得られた菌体乾燥物を9.0mass%添加した飼料を調整し、90日間連続添加した。体表の色調を目視により観察したところ菌体乾燥物を添加しない対象区に比べ赤色の着色が認められ色調が改善された。

【0048】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1452

配列の種類：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6
C 09 B 61/00
// C 12 N 15/09
C 12 Q 1/68
(C 12 N 1/20

識別記号 庁内整理番号
7823-4B
9282-4B

F I
C 09 B 61/00
C 12 Q 1/68
C 12 N 15/00

技術表示箇所

A
A
A

C 1 2 R 1:01)

(72) 発明者 水田 美能
神奈川県横浜市中区千鳥町 8 番地 日本石
油株式会社中央技術研究所内